

Rapport de Stage

Master 1

Biotraçabilité Biodétection Biodiversité

Caractérisation moléculaire de la biodiversité fongique et
identification précoce des champignons associés au
phénomène de dépérissement des palmiers à huile, en
particulier *Ganoderma boninense*

du 14 février 2011 au 15 juillet 2011

Cirad UR39

TA A-39/C

Campus international de Baillarguet

34398 Montpellier cedex 5

par Julie Gisbert

sous la direction du Dr. Alba Zaremski

Sommaire

Sommaire	
Remerciements	
Abréviations	
Table des figures	
1. Introduction	01
a) le Cirad et le projet GANODIV	01
b) situation, intérêt et problématique	02
c) quelle stratégie choisie	04
2. Matériel & méthode	05
a) matériel biologique	05
b) techniques	06
3. Résultats	10
4. Discussion	16
5. Conclusions	19
a) vis-à-vis de la problématique	19
b) vis-à-vis du stage	19
Références	
Annexes	

Remerciements

J'aimerais tout d'abord remercier le Dr. Zaremski de m'avoir accueillie au sein du CIRAD et pour m'avoir fait confiance.

Je remercie également Bénédicte Favreau et Alexandre Vaillant pour leur patience et l'écoute qu'ils m'ont accordé.

Je remercie aussi Malyna, Anthéa, Athéna, Victoria, Marie et Jonathan pour la bonne ambiance qui a régné entre nous.

Abréviations

CIRAD : Centre de coopération International en Recherche Agronomique pour le Développement

UR : Unité de Recherche

ADN : Acide Désoxyribonucléique

PCR : Polymerase Chain Reaction

ITS : Internal Transcribed Spacer

IGS : Intergenic Spacer

pb : paire de bases

BSR : Basal Stem Rot (pourriture de la base du stipe)

USR : Upper Stem Rot (pourriture du haut du stipe)

TAE : Tris Acetate EDTA

SDS : Sodium Dodécyl Sulfate

EDTA : Ethylen Diamine Tetra-acetic Acid

BLAST : Basic Local Alignment Search Tool

NCBI : National Center for Biotechnology Information

RFLP : Restriction Fragment Length Polymorphism

Table des figures

Figure 1 : Photo de carpophore de *Ganoderma boninense*

Figure 2 : Photo de palmier à huile

Figure 3 : Schéma de l'ADN ribosomal 5,8S

Figure 4 : Photo de tronc de palmier à huile numéro 2 d'Indonésie (série 1)

Figure 5 : Schéma du cycle PCR

Figure 6 : Marqueur Gene Ruler 50 pb DNA ladder

Figure 7 : Tableau des résultats de quantification de l'ADN total par spectrométrie (en $\mu\text{g/mL}$)

Figure 8 : Photo du gel 04

Figure 9 : Photo du gel 09

Figure 10 : Chromatogramme de plusieurs séquences

Figure 11 : Chromatogramme de D22b en ITS 4

Figure 12 : Tableau des résultats Blast

Figure 13 : Cladogramme des *Ganoderma* en ITS 4

1. Introduction

a) Le Cirad et le projet GANODIV

Le **Cirad** (Centre de coopération International en Recherche Agronomique pour le Développement) est un établissement public à caractère industriel et commercial, sous la tutelle du ministère de l'Enseignement supérieur et de la Recherche et du ministère des Affaires étrangères et européennes. En partenariat avec plus de 90 pays, particulièrement les pays du Sud, il se divise en trois départements de recherche, Système biologique (Bios), Performance des systèmes de production et de transformation tropicaux (Persyst) et Environnement et société (ES).

Ses activités relèvent des sciences du vivant, des sciences sociales et des sciences de l'ingénieur appliquées à l'agriculture, à l'alimentation et aux territoires ruraux.

Le projet, nommé **GANODIV** relève d'un partenariat entre le Cirad et PalmElit, une société spécialisée dans l'amélioration génétique du palmier à huile. PalmElit est présente principalement en Afrique, en Asie et en Amérique latine. L'une des unités du Cirad participante est l'UR 28 (Amélioration Génétique du Palmier à Huile), composée au total de 12 chercheurs et 3 techniciens localisés au Bénin, en Indonésie, en Colombie et en Equateur. La deuxième unité du CIRAD est l'UR 39 (Diversité génétique et amélioration des espèces forestières), composée au total de 11 chercheurs, 3 techniciens et 1 assistant se trouvant en Nouvelle-Calédonie, à l'INRA à Bordeaux et à Montpellier.

Le projet se déroule sur quatre ans de 2010 à 2014. Ce projet sur la diversité génétique de *Ganoderma boninense* regroupe trois équipes (PalmElit, UR 28 et UR 39) dont cinq chercheurs. Le financement commun entre le Cirad (21600 euros) et PalmElit (34300 euros) atteint un total de 55900 euros par an. Les responsables du projet sont Hubert De Franqueville et Alba Zaremski pour le Cirad et Tristan Durand-Gasselin pour PalmElit.

J'ai rejoint l'UR 39 en tant que stagiaire du Dr. Zaremski, le 14 février 2011 pour une durée de 5 mois, sur le site du CIRAD de Montpellier à Baillarguet. .



Figure 1 : Photo de carpophore de *Ganoderma boninense*

règne : Champignon, phylum : Basidiomycète, classe : Agaricomycète, ordre : Polyporales,
famille : Ganodermataceae, genre : *Ganoderma*, espèce : *Ganoderma boninense*



Figure 2 : Photo de palmier à huile

règne : Plante, phylum : Magnoliophyta, classe : Liliopsida, ordre : Arecales, famille : Arecaceae,
genre : *Elaeis*, espèce : *Elaeis oleifera*

Ce projet a d'innovant le fait que c'est la première fois qu'étude est conduite sur la biodiversité globale et mondiale de champignons associés au phénomène de dépérissement du palmier à huile. De plus, c'est également la première fois qu'une étude est menée à partir de tissus frais de palmier à huile, en effet jusque là, seuls des échantillons lyophilisés avaient été analysés.

b) Situation et problématique

Ganoderma Boninense (voir figure 1 « Photo de carpophore de *Ganoderma boninense* ») est un champignon basidiomycète du sol. Il est lignivore et responsable de la pourriture de la base du stipe ou BSR du palmier à huile. Ce champignon s'attaque au système vasculaire jusqu'à entraîner l'étouffement hydrique puis nutritionnel de l'arbre. Les re-plantations successives accentuent la gravité des dégâts. Les dégâts causés par *G. boninense* sont particulièrement importants en Asie du Sud Est. Mais il commence également à affecter des palmiers à huile en Afrique centrale et représente une menace pour les plantations d'Amérique latine (Breton F., De Franqueville H., Zaremski A. (janvier 2011) «Rapport de projet GANODIV»).

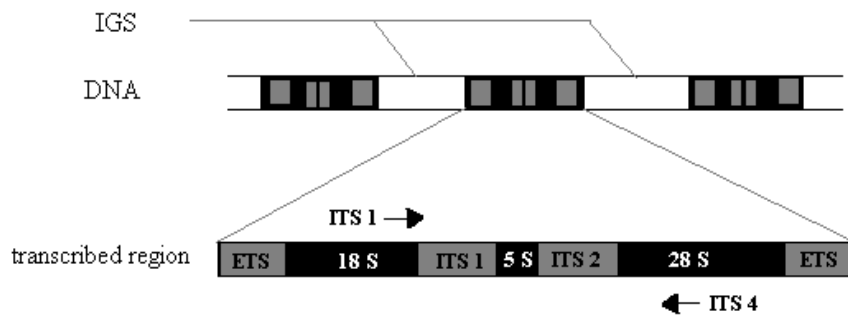
Le palmier à huile (*Elaeis guineensis* Jacq.) est une espèce d'intérêt agronomique (voir figure 2 « Photo de palmier à huile »). C'est l'oléagineux le plus productif avec des rendements moyens de 3 à 4 tonnes par hectare. Cela peut atteindre 7 tonnes dans les meilleures conditions. Il est cultivé pour son huile de palme, mais il a la particularité de produire une seconde huile totalement différente, l'huile de palmiste aux propriétés similaires. Une autre de ses particularités est que l'huile de palme bien que riche en acide gras saturés, se comporte comme une huile riche en acide gras polyinsaturés grâce à la structure glycéridique particulière. C'est une ou plusieurs espèces moléculaires de la fraction insaponifiable qui sont responsables de ce phénomène. Elle est d'ailleurs la seule huile à comporter des tocotriénols (analogue insaturé de la vitamine E). L'huile de palme est également la moins coûteuse à produire (Graille J., Pina M. (mars-avril 1999) «l'huile de palme : sa place dans l'alimentation humaine» Plantations, recherche, développement. Vol.6 n°2 : 85-90).

L'intérêt pour les espèces tropicales parmi lesquelles le palmier à huile ne commence que dans les années 1900 avec le début de l'expansion de l'agriculture tropicale et du commerce avec les régions chaudes (Steyaert R. L. (Dec. 31, 1967) «Les *Ganoderma* palmicoles» Bulletin du Jardin botanique national de Belgique, Vol. 37, No. 4, pp. 465-492). Les premières études sur *Ganoderma* et les premières observations de ses actions pathogènes sur les palmiers remontent au début du XXième siècle (Butler EJ. (1909) «Some diseases of palms» The Agricultural Journal of India I :

209-310). La maladie entraînée par *Ganoderma boninense* se distingue en deux symptômes majeurs, dont la pourriture de la base du stipe. Il y a d'abord l'infection du plant se déroulant entre 1 et 4 ans. Durant cette phase l'infection s'installe via le système racinaire, lorsque les plants de palmier sont plantés trop près d'une source d'infection. Les spores ne jouent aucun rôle dans cette phase. Au bout de 6 ans, les premiers signes d'infections apparaissent avec un léger jaunissement des jeunes feuilles puis l'infection se propage et affecte le développement des fruits. C'est le BSR. Un deuxième symptôme s'observe à partir de 12 ans après l'infection. C'est l'USR. L'infection se manifeste alors par l'apparition de lésions à 1,5 m de hauteur sur le tronc (Sanderson F.R. (2005) << An insight into spore dispersal of *Ganoderma boninense* on oil palm >> Mycopathologia 159: 139–141). Mais bien que causés par le même champignon, le BSR et l'USR sont deux phénomènes indépendant et l'USR n'a jamais pu être reproduite artificiellement contrairement au BSR (communication Hubert De Franqueville).

Les similarités entre les séquences ITS, internal transcribed spacers, ont permis d'étudier largement la taxonomie de *Ganoderma* et de le classer avec d'autres espèces associées au palmier. Les variations de séquences observées dans la région ITS2 sont très utilisées pour différencier les espèces fongiques. Particulièrement, il existe trois différents segments en région 3' terminale de la séquence ITS2. Ces trois segments varient en taille et concentration en acide nucléique C et G et permettent de distinguer les différentes espèces de champignons (Panchal G., Bridge P.D. (2005) << Following basal stem rot in young oil palm plantings >> Mycopathologia 159: 123–127).

White *et al.* (1990) ont défini les premières amorces de PCR pour l'amplification des gènes codant pour l'ADNr 18S et ITS fongiques. Bien que ces amorces ont été dessinées alors que les informations de séquences étaient limitées, elles se sont avérées être des instruments très puissants et sont toujours largement utilisées. Ce sont les séquences ITS1 et ITS2 que nous avons décidé de cibler, afin d'étudier l'ensemble des champignons présents sur les palmiers. Pour cela nous utilisons les amorces ITS1 et ITS4 encadrant les régions ITS1, 5,8S (d'environ 100 paires de base) et ITS2. Les séquences obtenues ont une taille comprise entre 500 et 800 paires de base. Ce couple d'amorces permet d'amplifier spécifiquement les séquences d'ADN fongiques. Si nous nous étions uniquement intéressés à *Ganoderma boninense* nous aurions pu utiliser l'amorce GanET (spécifique de *G. boninense*) couplée à l'amorce ITS3, qui cible une des trois séquences variables de cette région (Pilotti C.A., Bridge P.D. (2002) << Basal stem rot: probing the facts >> The Planter; 78(916): 365–370). Il est possible également de réaliser une RFLP à la suite de la PCR grâce à trois couples d'amorces/sondes, afin de ne cibler que le champignon *Ganoderma* . Cette technique sera utilisée dans cette étude mais ce n'est pas à moi qu'a été confié ce travail.



Korabecna M. <<[The Variability in the Fungal Ribosomal DNA \(ITS1, ITS2, and 5.8 S rRNA Gene\): Its Biological Meaning and Application in Medical Mycology](#)>> [Communicating Current Research and Educational Topics and Trends in Applied Microbiology](#)

Figure 3 : Schéma de l'ADN ribosomal 5,8S

Représentation schématique du locus de l'ADN ribosomique et de l'ITS (Internal Transcribed Spacer) chez les organismes eucaryotes. Les flèches noires représentent les amorces utilisées en écologie moléculaire des champignons. Ce schéma permet de localiser le site de fixation de ces amorces spécifiques nécessaire à l'amplification de l'ITS. Les ETS sont les external transcribed spacers et les IGS sont les non-transcribed intergenic spacers.

c) Stratégie choisie et Objectifs recherchés

Les chercheurs engagés dans ce projet ont fait le choix de réaliser plusieurs collectes de carpophores et de tissus frais de palmier à huile susceptibles d'être infestés par *Ganoderma*. Ces collectes sont réalisées dans les plantations de palmier à huile du monde entier afin de construire une banque de données moléculaires regroupant les champignons lignivores tels que *Ganoderma boninense*. Ils utilisent des méthodes de biologie moléculaire afin de réaliser l'extraction des ADN totaux et l'amplification des espèces fongiques uniquement, grâce aux amorces ITS1 et ITS4 spécifiques du règne fongique. Elles correspondent aux séquences flanquantes intergéniques de l'ADN ribosomique 5,8S (voir Figure 3: « schéma de l'ADN ribosomal 5,8S »). Ces amorces permettent l'amplification des régions ITS1, ITS2 et 5,8S variables chez les champignons. Le protocole d'amplification adapté aux champignons mycorhiziens, inspiré par White et al. (1990) et mis au point au Laboratoire des symbiotes des Racines (LSTM) par Montembault (1995) et Alcon (1996) a été utilisé. Le séquençage est sous-traité au près d'une société Sud Coréenne, Macrogen.

L'objectif de cette étude est l'enrichissement d'une banque de données permettant à terme de regrouper les champignons responsables du dépérissement du palmier à huile à travers le monde et de déterminer les interactions qui les lient.

Mon rôle durant ces 6 mois de stage sera de traiter des échantillons récoltés en 2010, ceux d'Indonésie, mais également ceux sur lesquels de précédentes manipulations n'ont pas abouti à des résultats concluants, ainsi que des échantillons récoltés au Bénin début 2011 et en Indonésie début Mars 2011. On peut distinguer deux phases majeures dans le déroulement de mon stage. Il me faudra d'abord, extraire les ADN, quantifier ces ADN avec un spectrophotomètre, les amplifier par PCR, vérifier leur bonne amplification par électrophorèse. Puis dans un deuxième temps il me faudra réaliser à partir des séquences obtenues, une analyse Blast et réaliser des arbres phylogénétiques afin de déterminer la distance génétique entre les espèces fongiques et entre celles présentes dans les tissus de palmier à huile et peut être mettre en évidence une relation entre les espèces, la localisation et l'âge des palmiers à huile infectés. Enfin, en parallèle de ces deux étapes, une étude RFLP sera réalisée sur les échantillons identifiés comme appartenant au genre *Ganoderma* et une étude morphologique sera réalisée à partir de mycélium régénéré et pur mais cela ne sera pas présenté dans ce rapport.

2. Matériel et méthodes

a) Matériel biologique

Les échantillons proviennent en grande majorité d'Indonésie, du site de Tanah Gambus. Il y a deux séries :

Une première série de 31 échantillons récoltés en septembre 2010 et conservés à -20°C :

17 sont des carpophores (noté « Ind. »); dont un issu de la nurserie (noté « Ind.29N » car il s'agit du 29ième échantillon).

13 sont des morceaux de troncs de palmiers à huile suspectés d'être infectés (noté par des chiffres, exemple « 2.0 » est le premier fragment du tronc n°2). Il y a 62 sous échantillons de troncs.

Une deuxième série de 28 échantillons récoltés en mars 2011 est conservée à 4°C :

16 sont des carpophores (noté « D. ») (voir annexe a)

12 sont des morceaux de troncs (noté « D. ») (voir annexe a)

12 autres échantillons proviennent du Bénin, ils sont distingués en trois catégories :

en parcelle (noté « P »), au nombre de 5,

en oleifera (noté « O »), au nombre de 4,

en Bénin (noté « B »), au nombre de 3.

Cette notation a été choisie en fonction des indications données par les fiches envoyées avec les champignons.

Enfin, nous avons repris des échantillons issus de travaux de l'an dernier, car ils n'avaient pas donné de résultats satisfaisant. Il y en a 23. Pour la nomenclature, j'ai choisi de conserver celle de l'an dernier. La liste de tous échantillons est détaillée en annexe a.

Nous avons choisi trois témoins positifs : *G. lucidum* (noté « t (+) G.l »), *G. athensorii* (noté « t (+) G.a »), et IC 14, un champignon identifié lors d'une étude précédente. Un témoin négatif a été réalisé avec de l'eau millipore (noté « t - »). Un dernier échantillon provenant d'Indonésie, est un tissu frais de palmier à huile dont l'infection au *Ganoderma* est observable au niveau macroscopique. Il sera considéré comme un témoin positif (noté « t (+) NJ3 »).

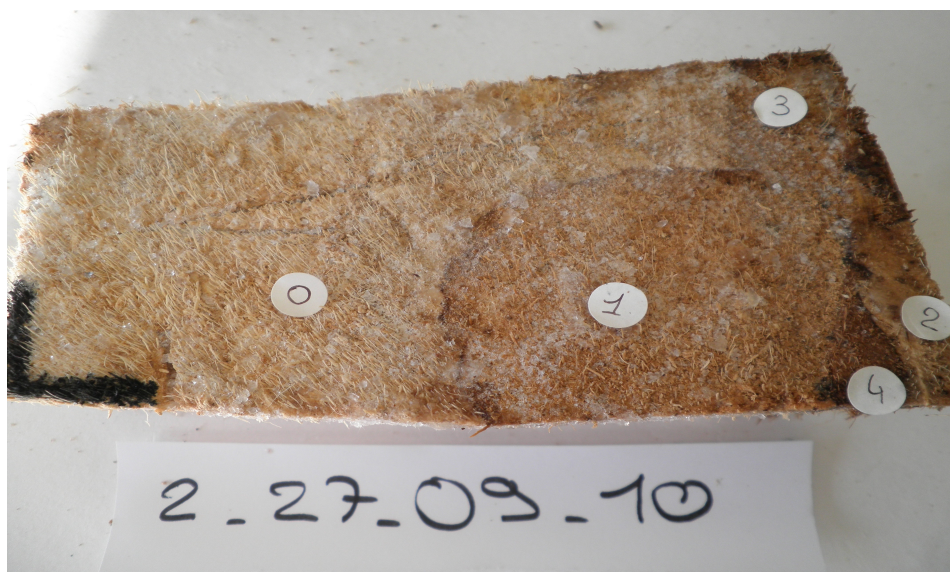


Figure 4 : Photo de tronc de palmier à huile numéro 2 d'Indonésie (série 1)

Ici, les couleurs du bois sont numérotées de 0 à 4, de la plus claire à la plus colorée. Le choix des faces à observer s'est fait de manière totalement arbitraire. Une seule face par tronc a été choisie à chaque fois.

b) Techniques

Pour pouvoir faire plus tard une étude morphologique et une comparaison entre la morphologie du champignon et la séquence obtenue lui correspondant, nous prenons en photos chaque champignon. Les coupes de troncs de palmier à huile ont été observées à la loupe, et nous avons repéré des zones de couleurs différentes à l'aide de pastilles numérotées (le « 0 » étant attribué à la zone la plus claire) afin de prélever plus tard des échantillons de ces zones, pour la réalisation d'une extraction. En effet ces zones colorées sont potentiellement infestées par le champignon (voir figure 4 : « photo de tronc de palmier à huile numéro 2 d'Indonésie »).

Nous réduisons en poudre tous nos échantillons avec de l'azote liquide avant de leur faire subir un choc thermique et un broyage mécanique. Puis nous suivons le protocole établi par InvitroGen pour l'extraction. La qualité et la concentration des ADN extraits seront vérifiées par spectrométrie (BioSpec Mini de Shimadzu). Puis nous réalisons une PCR (Mastercycler Eppendorf) afin d'amplifier la quantité présent d'ADN avant de les envoyer à une société de séquençage. Une fois les ADN séquencés, ils nous sont retournés pour les soumettre à une analyse BLAST pour être comparés à celles des banques via le site NCBI. Cette analyse nous permettra de réaliser un arbre phylogénétique de *Ganoderma boninense*. En parallèle, une étude AFLP sur le site de SupAgro et une étude morphologique seront réalisées.

- **Prélèvement et réduction en poudre :**

Frotter ou râper (selon la dureté de l'échantillon) les échantillons pour obtenir des fragments facilement manipulables.

Pour les fragments de troncs, nous avons prévu d'utiliser une tarière; appareil permettant de faire des trous dans des structures telles que le bois. Mais malgré sa commande, la tarière n'a jamais été livrée. Nous avons alors utilisé un scalpel.

Peser 100 mg de chaque échantillon et placer les dans un mortier en marbre.

Ajouter de l'azote liquide et broyer avec le pilon afin d'obtenir une poudre fine.

Placer cette poudre dans un tube eppendorf stérile de 1,5 mL.

Conserver à -70°C avant l'extraction.

- **Extraction D'ADN :**

Placer les tubes eppendorf dans l'azote liquide pendant 3 minutes, Après les avoir laissé sur la paillasse 1 minute, placer sur une plaque chauffante à 95°C pendant 3 minutes, afin de réaliser un choc thermique. Répéter ces deux étapes trois fois de suite afin que le choc thermique soit effectif.

Ajouter deux billes de métal dans les tubes afin de réaliser un broyage mécanique grâce à un broyeur à bille, et cela afin de compléter la méthode d'extraction de l'ADN par choc thermique.

Suivant le protocole établi par InvitroGen, (« Pure Link Plant Total DNA Purification Kit For purification of DNA from plant ») ajouter 250 µL (pour 100mg d'échantillon) du tampon de suspension R2 (voir annexe b) placé préalablement à température ambiante. Vortexer afin de bien mélanger.

Ajouter 15 µL de SDS à 20% et 15 µL de RNase A (fournis par InvitroGen) afin d'obtenir un lysat et incubé à 55°C pendant 15 minutes pour compléter la lyse.

Centrifuger les tubes à 12600 g pendant 5 minutes afin d'éliminer le matériel insoluble. Récupérer le surnageant et le placer dans un tube eppendorf stérile de 1,5 mL et ajouter 100 µL du tampon de précipitation N2. Vortexer

Placer les tubes dans la glace pendant 5 minutes afin de précipiter les protéines.

Centrifuger à température ambiante les tubes à 12600 g pendant 5 minutes et prélever 250 µL de lysat pour les placer dans un tube eppendorf stérile de 1,5 mL.

Ajouter 375 µL du tampon de liaison B4 auquel sont ajoutés 11,25 mL d'éthanol. Vortexer.

Placer cette solution sur une colonne InvitroGen et centrifuger à 5600 g pendant 1 minute à température ambiante.

Récupérer la colonne, contenant l'ADN, et la placer dans un nouveau tube stérile de 2 mL.

Ajouter 500 µL du tampon de lavage W4 et centrifuger à 5600 g pendant 1 minute.

Récupérer la colonne et la placer dans un nouveau tube stérile de 2 mL.

Ajouter 500 µL du tampon W5 auquel sont ajoutés 40 mL d'éthanol et centrifuger à 5600 g pendant 1 minute.

Récupérer la colonne et la placer dans un nouveau tube stérile de 2 mL.

Centrifuger à 12600 g pendant 2 minutes afin d'éliminer le reste de W5 éventuellement présent dans la colonne.

Récupérer la colonne et la placer dans un nouveau tube stérile de 1,5 mL.

Ajouter 100 µL du tampon d'élution E1, laisser le tube sur la paillasse pendant 1 minute et centrifuger à 12600 g pendant 1 minute à température ambiante. L'ADN se trouve maintenant dans le tube. Jeter la colonne. Les produits d'extraction sont conservés à -20°C .



spectromètre Biospec Mini Shimadzu

écran d'affichage du Biospec Mini

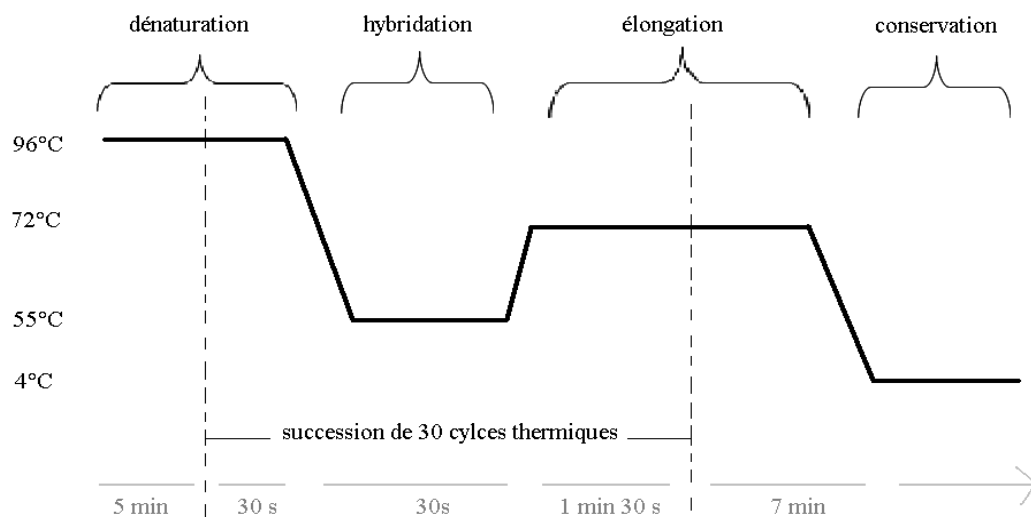


Figure 5 : Schéma du cycle PCR

- Vérification de la pureté et de la concentration de l'ADN de chaque échantillon :

Cela va être réalisé grâce à l'utilisation d'un spectrophotomètre biospec mini Shimadzu. Parmi les mesures effectuées, l'appareil affichera sur l'écran les absorbances à 260 nm, à 280 nm, le ratio 260/280, ainsi que la concentration de l'échantillon. Ce sont là les données qui nous intéressent.

Le ratio des absorbances à 260 nm et 280 nm nous renseigne sur la pureté des échantillons.

Pour réaliser ces mesures, il faut déposer 3 µL d'ADN extrait sur la cuve, puis refermer avec un capuchon adapté. Dans ce spectrophotomètre, le rayon ne traverse pas une cuve transparente de 1 cm de largeur. Il s'agit, par un jeu de miroirs, d'amener le rayon jusqu'à l'échantillon et de le renvoyer grâce au miroir se trouvant sur la face interne du capuchon. J'utilise la cuve de 1 mm, ce qui signifie que le trajet optique à travers l'échantillon est de 1 mm, le capuchon doit correspondre à la cuve utilisée, j'utilise donc le capuchon noté 1 mm. L'appareil ne prend pas en compte le fait que le trajet optique ait été divisé par 10 par rapport à la valeur standard de 1 cm, il me faudra donc multiplier par 10 les valeurs de concentrations obtenues.

- **Réalisation d'une PCR sur les ADN extraits :**

Dans un volume réactionnel final de 50 µL, on place 5 µL de produit d'extraction, 4 µL de dNTP, 10 µL du tampon 5X de PCR auquel a déjà été ajouté le $MgCl_2$, 2 µL de chaque amorce ITS1 et ITS4 à 20 pmol/µL, 26,7 µL d'eau millipore et 0,30 µL de Taq polymérase (GoTaq et Phusion). Le design des amorces est en annexe b.

On ajoute deux gouttes d'huile dans le puits, par dessus le mélange PCR.

Dans ce protocole la PCR compte 30 cycles. La dénaturation se fait à 96°C. Pour l'hybridation la température est diminuée jusqu'à 55°C. Enfin l'élongation est réalisée à 72°C (voir Figure 5 : « Schéma du cycle PCR »). Les produits PCR sont conservés à -20°C.

- **Migration sur gel d'agarose :**

Il s'agit de vérifier si l'amplification a bien fonctionné et si aucun artefact de réplication ne s'est formé. En effet, nous avons choisi de ne pas purifier les fragments d'ADN amplifiés à partir des gels.

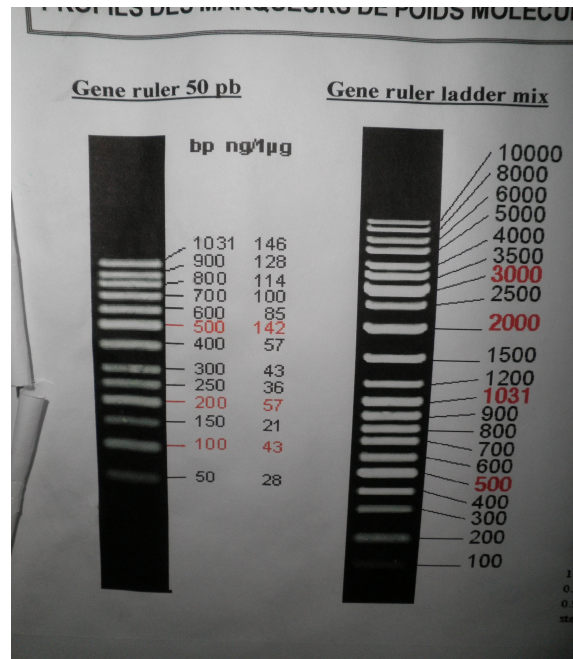


Figure 6 : Marqueur Gene Ruler 50 pb DNA ladder

C'est le marqueur de poids moléculaire Gene Ruler 50 pb DNA ladder (à gauche) qui a été utilisé préférentiellement car le fragment d'ADN amplifié a une taille attendue d'environ 600 pb.

Le choix d'un gel d'agarose à 0,8%, nous contraint à utiliser des supports de petite taille car à cette concentration le gel est très friable. Pour réaliser ce gel, nous pesons 0,80 g d'Agarose. Le tampon de migration est du TAE (Tris, Acetate, EDTA) 1X. Ne disposant que de TAE 50X, il a fallu effectuer une dilution en mélangeant 2 mL de TAE 50X avec 98 mL d'eau distillée, pour un volume final de 100 mL. Il faut 400 mL de tampon TAE 1X pour remplir la cuve et recouvrir le gel.

Sur une plaque de transfert, 2 µL de tampon de charge 6X et 5 µL de produits PCR sont déposés. Puis 5 µL de marqueur de poids moléculaire ; le Gene Ruler 50 pb DNA ladder (voir photo n°1 « Marqueur Gene Ruler 50 pb DNA ladder »); et 5µL de mélange sont déposés dans les puits. La migration s'effectue à 125V pendant 35 minutes. Puis nous lavons le gel dans un bain faiblement concentré en BET, et nous le rinçons avant la révélation des bandes sous les ultra-violets.

- **Purification des ADN à partir du gel :**

La société de séquençage à laquelle nous faisons appel pour le séquençage nous propose de purifier nos ADN en plus du séquençage et cela au même tarif ; soit 4 euros par échantillon à partir des produits PCR. MacroGen utilise le 3730XL DNA séquenceur pour réaliser le séquençage de nos échantillons.

- **Utilisation de Blast via NCBI et construction d'arbres phylogénétiques :**

Le site NCBI met à notre disposition le logiciel Blast. Ce programme nous permet de comparer les séquences, obtenues à l'issue du séquençage, avec une banque de données en ligne. Blast nous fournira alors une liste d'espèces présentant de forte similarité et homologie de séquence avec celle testée. Ce sera à nous de déterminer à quelle espèce correspond notre séquence testée. Pour vérifier les résultats de Blast obtenus par la société MacroGen, nous utiliserons aussi le logiciel d'alignement BioEdit, afin de nettoyer les séquences avant de soumettre à nouveau à Blast.

Pour réaliser des arbres phylogénétiques, nous utilisons la fonction ClustalW Multiple Alignment du logiciel BioEdit pour aligner toutes les séquences en ITS1 de *Ganoderma*, toutes les séquences en ITS4 de *Ganoderma* et toutes les séquences de champignons et levures en ITS1 puis en ITS 4. Chaque alignement est enregistré dans un fichier qui est ensuite ouvert avec le logiciel SeaView4. En appliquant la « distance method », nous obtenons un arbre phylogénétique que nous organisons en « squared » pour une représentation plus réaliste, mais pour une représentation plus facile de lecture et d'interprétation, nous organisons l'arbre en « cladogramm ».

3. Résultats

- **Extraction d'ADN :**

Malgré le fait de laisser les tubes eppendorfs sur la paillasse 1 minute avant de les placer sur la plaque chauffante, j'ai constaté que des tubes s'ouvraient sous l'effet de la pression et répandaient du matériel biologique hors du tube. J'ai décidé de conserver l'étape de repos sur la paillasse d'une minute mais de laisser les eppendorfs ouverts sur la plaque et couverts d'un papier d'aluminium.

Il est apparu que 100 mg de matière fraîche est beaucoup trop élevé pour la réalisation de l'extraction des carpophores. En effet, à la suite de l'ajout de SDS et de RNase A et de la centrifugation permettant de séparer le matériel insoluble du lysat, il était impossible de prélever de la solution car le liquide était complètement absorbé par la matière. Alors nous avons décidé de dédoubler les eppendorfs (deux tubes de 50 mg) jusqu'à cette étape, à laquelle le lysat prélevé dans les deux eppendorfs est placé dans un seul nouvel eppendorf. La suite du protocole se déroule comme précédemment expliqué.

Puisque je n'avais aucune donnée concernant le paramétrage du broyeur à bille pour les champignons, j'ai suivi les conseils du technicien de laboratoire et ai réglé l'appareil sur une fréquence de 30 s^{-1} et une durée d'une minute. Ces réglages se sont avérés efficaces pour obtenir une poudre pour les carpophores, mais dans le cas du bois, tous les échantillons n'ont pas été broyés alors qu'une grande majorité était bien réduite en poudre.

Cette différence peut être due à la texture du bois ; qui pouvait varier beaucoup au sein d'un même morceau de tronc. Cela peut être dû à la manière dont le bois a été réduit en poudre. Pour remédier à cela, nous pourrions ajouter une ou plusieurs billes en plus afin que les frottements soient plus forts, ou encore modifier les paramètres de la machine. Mais cela demanderait beaucoup de temps pour réaliser une étude complète et rigoureuse permettant de déterminer les paramètres exacts pour chaque bois, en fonction de son état (sain ou infecté), de sa composition, ou de la manière dont l'échantillon a été réduit en poudre.

Manquant d'azote liquide et ne voulant pas perturber le planning que j'avais mis en place, j'ai choisi de passer l'étape du choc thermique pour passer directement au broyage par le broyeur à billes, en attendant la livraison de l'azote liquide. Cela ne concerne pas tous les échantillons mais

catégorie	valeur maximale	valeur minimale	moyenne	écart type
Carpophore Série 1	110,44	0,244	12,98	13,81
Troncs Série 1	17,3	0,549	4,80	3,88
Duplicate Carpophore Série 1	55,5	2,2	13,01	14,68
Duplicate Troncs Série 1	4,94	0,85	3,03	1,14
Carpophore Série 2	5,43	0,12	2,32	2,14
Troncs Série 2	19,3	0,31	5,86	6,57
Indéterminés 2010	8,667	0,244	3,39	2,55
Equateur	30,92	6,226	13,08	10,94
an passé	198,3	1,7	38,52	33,26

Figure 7 : Tableau des résultats de quantification de l'ADN total par spectrométrie (en µg/mL)

seulement 37 : les fragment de troncs 7.4 à 22.5.

- **Vérification de la pureté et de la concentration de l'ADN de chaque échantillon :**

Les résultats du spectrophotomètre indiquent pour les carpophores de la première série, des concentrations en ADN variées ; la plus faible étant 244, 10 ng/mL et la plus élevée étant 110,44 µg/mL. La moyenne est de 12,98 µg/mL pour les carpophores d'Indonésie et l'écart type est de 13,81.

Pour les échantillons du Bénin, la moyenne est de 13,08µg/mL et l'écart type est de 10,94.

Pour les carpophores de l'année précédente, la moyenne est de 3,39 µg/mL et l'écart type est de 2,55.

Pour les troncs de palmiers à huile de la première série, les concentrations sont encore plus faibles, allant de 549,3 ng/mL à seulement 17,3 µg/mL. Les ADN extraits du bois présentent une concentration moyenne de 4,80 µg/mL et un écart type de 3,88.

Pour les échantillons de la deuxième série, la concentration moyenne est de 2,32 µg/mL et l'écart type est de 2,14 µg/mL pour les carpophores. Pour les troncs, la concentration moyenne est de 5,86 µg/mL et l'écart-type est de 6,57 µg/mL.

Pour les duplicatas de la première série, la concentration moyenne des carpophores est de 13,01 µg/mL et l'écart type est de 14,68 µg/mL. Pour les troncs, la concentration moyenne est de 3,03 µg/mL et l'écart-type est de 1,14 µg/mL.

Néanmoins la quasi totalité des absorbances sont hors des limites de détection du spectrophotomètre, les concentrations obtenues ne sont donc pas fiables. Mais nous ne souhaitons pas obtenir de valeurs précises mais seulement nous assurer qu'il y a de l'ADN et connaître sa pureté.

Mais dans leur majorité ces concentrations sont très faibles par rapport à ce qui était attendu. En effet l'an dernier la concentration moyenne était de 38,52 µg/mL pour un écart type de 33,26. De plus le témoin négatif « t- » présente des contaminations (3,784 µg/mL). Toutes les valeurs sont reportées dans la figure 7 « tableau des résultats de quantification de l'ADN total par spectrométrie ».

Cela peut être du à une mauvaise manipulation lors de l'extraction ou à un mauvais conditionnement des champignons. Le protocole était déjà celui utilisé l'année précédente et il a donné des résultats satisfaisants, ce qui m'amène à ne pas le remettre totalement en cause. Néanmoins il apparaît qu'il n'est pas adapté à tous les types d'échantillons.

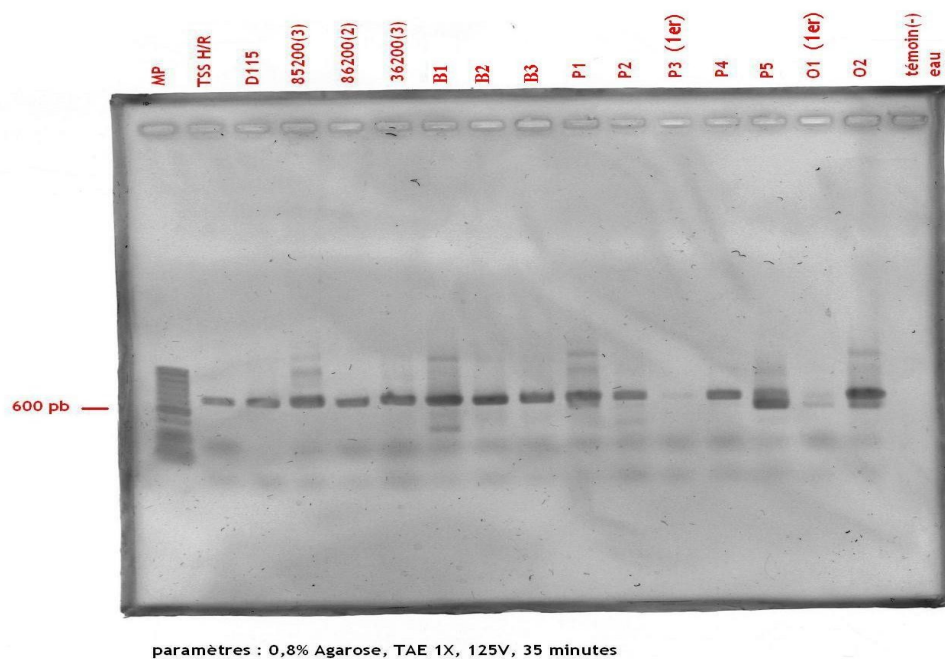


Figure 8 : Photo du gel 04

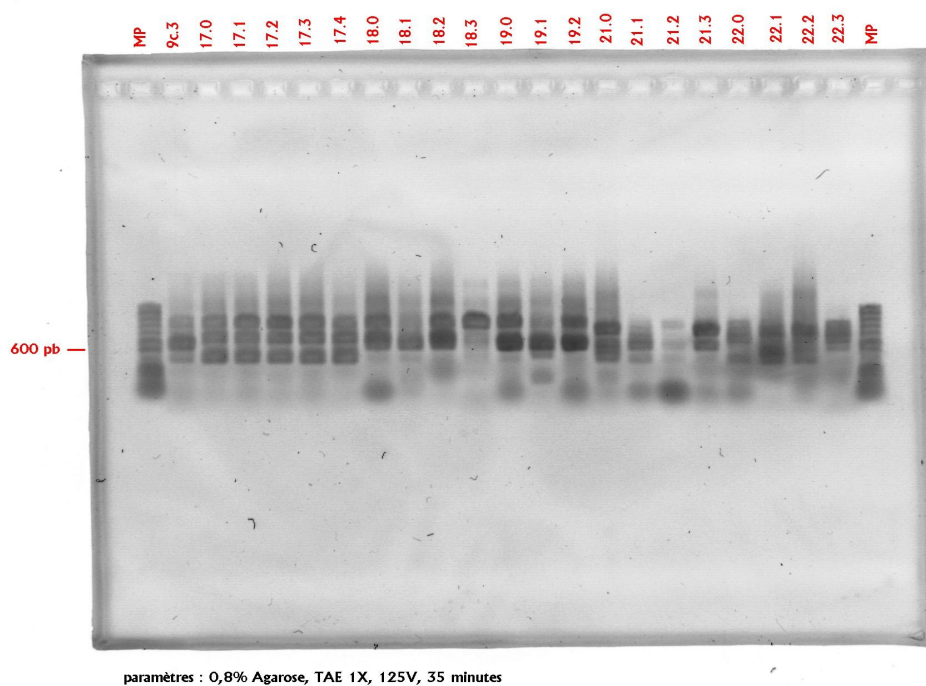


Figure 9 : Photo du gel 09

- **Réalisation d'une PCR sur les ADN extraits :**

Nous faisons le choix de ne pas utiliser du tampon de PCR mélangé au colorant du tampon de charge car la société de séquençage à laquelle nous enverrons nos produits PCR, refuse de traiter les échantillons contenant le tampon de charge coloré car il est toxique. Pour la première série d'échantillons, il a fallu refaire une PCR pour 16 échantillons de carpophores qui ne donnaient rien sur gel d'agarose. A la suite de cette seconde PCR, 3 échantillons restaient encore non amplifiés. Mais une troisième PCR nous a permis d'amplifier un des trois échantillons. Une quatrième PCR a été réalisée sur les deux derniers échantillons et encore un dernier n'a pas été amplifié. Nous avons décidé de l'envoyer quand même à la société de séquençage. La non révélation des échantillons sur le gel peut être due à un mauvais mélange des réactifs de PCR ou un oubli d'ajout de la polymérase, des dNTP ou des amorces dans ces puits là.

Les contaminations estimées lors du passage en spectrométrie sont confirmées par la présence de plusieurs bandes de poids moléculaires, supérieurs comme inférieurs à notre échantillon amplifié. Mais tous ne présentent pas de contaminations (voir Figure 8 : « photo du gel 04 »).

- **Migration sur gel d'agarose :**

Au total, 23 gels ont été réalisés. On visualise correctement le marqueur de poids moléculaire et une bande nette avec un poids moléculaire d'approximativement 700 paires de bases. Néanmoins d'autres bandes, autant inférieures que supérieures à 700 paires de bases, sont également visibles. Si dans le cas des carpophores leurs intensités est plus faible que celle du fragment recherché, dans le cas des troncs de palmier à huile l'intensité de certaines de ces bandes est équivalente à celle du fragment d'intérêt. Cela signifierait qu'il y aurait plusieurs espèces fongiques présentes dans nos échantillons ou que les amorces choisies ne sont pas spécifiques aux espèces fongiques et amplifieraient l'ADN du palmier à huile ainsi que de levures, champignons et de bactéries. Sur 148 dépôts sur gels pour la série 1, les échantillons du Bénin et les indéterminés, 40 dépôts présentaient des contaminations, soit 27% des dépôts totaux. Mais ces contaminations peuvent être des artefacts de répllication ou, dans le cas du bois de palmier à huile, l'amplification d'autres champignons. En effet, les bandes supplémentaires étaient aussi visibles que celle à 700 pb (voir Figure 9 : « photo du gel 09 »). Sur les 93 dépôts sur les gels pour la série 2, 12 dépôts présentaient des contaminations, soit 11,16 % des dépôts totaux. De plus, il a fallu reprendre 16 échantillons qui n'ont pas été amplifiés dès la première PCR.

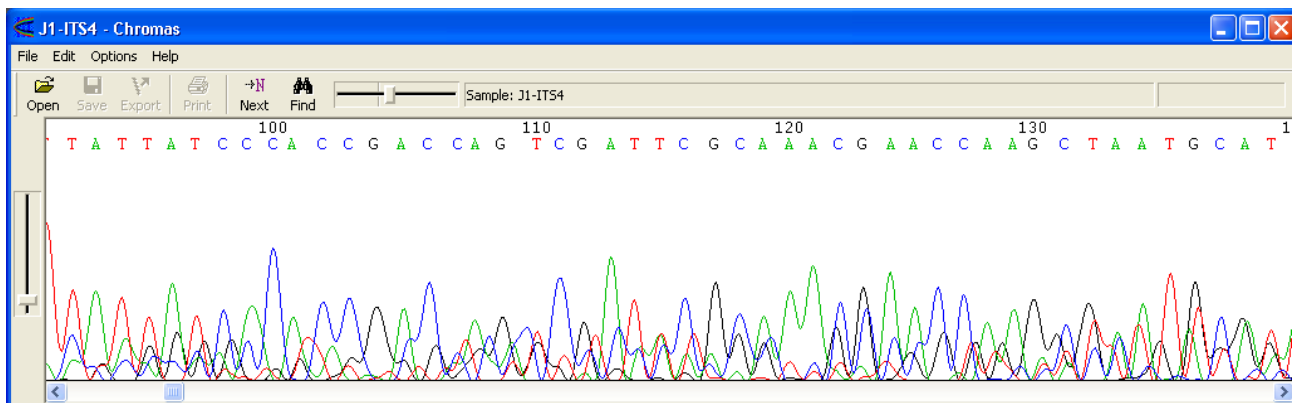


Figure 10 : Chromatogramme de plusieurs séquences

Dans cette fenêtre du logiciel Chromas, nous pouvons observer entre deux et trois séquences se chevauchant.

Des PCR sur des produits d'extraction dilués au 1/100 puis au 1/1000 ont été réalisées afin de vérifier que l'absence d'amplification n'était pas due à une concentration trop élevée des échantillons comme cela peut être parfois le cas. Aucun des 17 échantillons dilués n'a été amplifié.

Sur les 45 dépôts sur gels pour les duplicatas de la série 1, 23 dépôts présentaient des contaminations, 51 % des dépôts totaux. Aucune dilution n'a été effectuée pour cette série d'échantillons. De plus nous constatons que l'amplification est plus fréquente (67%) et plus importante pour cette série d'échantillons que pour les précédentes (55 %). Cela peut être dû au changement effectué dans le protocole pour les duplicatas. En effet nous avons changé d'enzyme. Il s'agit toujours de la Taq polymérase mais jusqu'à maintenant nous utilisions l'enzyme de la marque GoTaq. Afin de tester la qualité de la Taq Phusion ; connue pour être plus efficace que la GoTaq ; nous l'avons utilisée pour la dernière série d'échantillons.

- **Nettoyage des séquences analyse par Blastn et alignement :**

Une première analyse Blast, réalisée par la société de séquençage, n'a pas fourni une majorité de *Ganoderma boninense* en premier résultat. En effet sur les 100 premiers échantillons, 31 seulement sont identifiés par Blast comme étant du *Ganoderma*, 13 sont d'autres champignons et 31 sont des levures. Les autres résultats sont des plantes, des bactéries, des insectes et des mammifères. Cela nous a conduit à effectuer un nettoyage de séquence via le logiciel BioEdit afin de vérifier que les profils des chromatogrammes sont en accord avec les séquences obtenues.

J'ai repris toutes les séquences, même celles dont le Blast de la séquence entière, réalisé par MacroGen, ont eu pour résultat *G. boninense*.

Pour une majorité des échantillons plusieurs espèces ont été amplifiées, ce qui a pour conséquences de fausser complètement la lecture du chromatogramme (voir Figure 10 : « Chromatogramme de plusieurs séquences »). Néanmoins, si on ne tient pas compte de ce fait et qu'on tente une interprétation des résultats Blast, on constate que parmi les 18 carpophores de la série 1, seulement 5 sont identifiés comme du *Ganoderma* alors que morphologiquement ils ont été prélevés parce qu'ils appartenaient au genre *Ganoderma*. Parmi les 23 échantillons non identifiés de l'an dernier 21 sont du genre *Ganoderma*.

Aucun des fragments de tissus infectés ou supposés de la série 1, n'a eu pour résultat *Ganoderma*.

Les volumes réactionnels des PCR pour les échantillons de la série 1, du Bénin et les indéterminés n'étaient pas suffisamment grands pour nous permettre d'envoyer à séquencer les

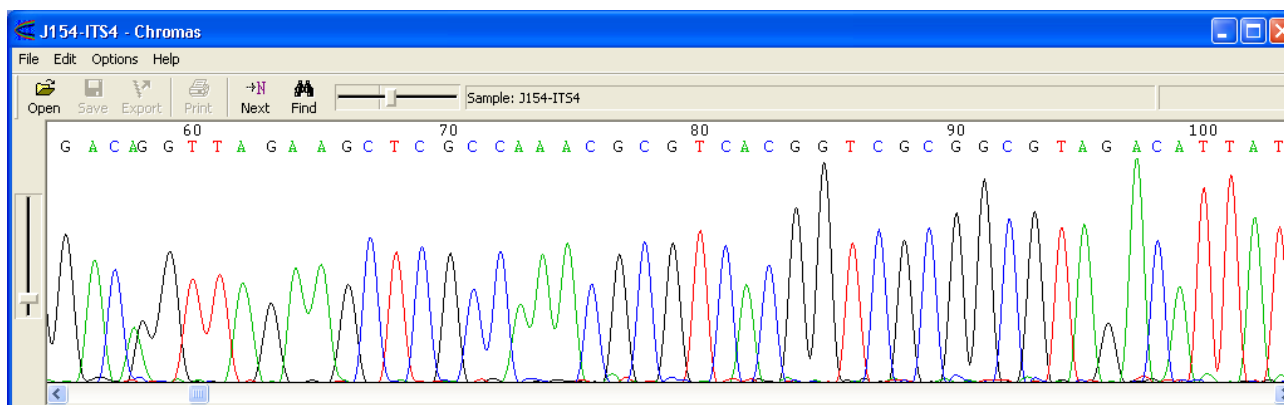


Figure 11 : Chromatogramme de D22b en ITS 4

Dans cette fenêtre du logiciel Chromas, nous observons une seule séquence et un léger bruit de fond

Organisme	<i>Ganoderma</i>	Champignon et levure	plante	non cultivable	autre
total	42	103	19	14	7
pourcentage	17,0	41,7	7,69	5,67	2,83

Figure 12 : Tableau des résultats Blast

produits PCR pour l'amorce ITS1 et pour l'amorce ITS4 à la fois. Nous avons choisi de les faire séquencer pour l'ITS 4 car généralement c'est l'amorce qui permet d'obtenir les meilleurs résultats. Pour les échantillons du deuxième envoi, toutes les séquences ne nous sont pas revenues de MagroGen. Sur les 58 tubes envoyés seulement 10 nous sont revenus mais contrairement aux précédents échantillons, les chromatogrammes de ces 10 duplicatas ne présentent pas de contaminants et les résultats Blast qu'on obtient à partir de ces séquences sont fiables (voir Figure 11 : « Chromatogramme de D22b en ITS 4 »). Néanmoins seul 2 séquences correspondent au genre *Ganoderma*, il s'avère que se sont le même échantillon D22b séquencé pour l'ITS 1 et pour l'ITS 4. Ce résultat est très encourageant dans l'optique où nous soumettrions cette séquence à GenBank. Toutes les séquences du troisième envoi à MagroGen nous sont revenues mais parmi ces 69 séquences, 13 n'ont donné aucun résultat Blast d'ailleurs leur chromatogramme ne présentaient aucune séquence véritable mais seulement un bruit de fond.

Après retour de tous les résultats il apparaît que *Ganoderma boninense* n'est pas l'espèce majoritaire. En effet sur 247 tubes envoyés au séquençage seulement 42 appartiennent à l'espèce *Ganoderma*, soit 17% et 62 échantillons étaient inexploitable soit 25,10% (voir Figure 12 : « Tableau des résultats Blast »). Le tableau détaillant les résultats échantillon par échantillon est en annexe c.

Afin de déterminer l'éloignement génétique entre les différentes séquences et de pouvoir réaliser des arbres phylogénétiques, nous les alignons à l'aide du logiciel BioEdit. Pour commencer, j'ai importé des séquences de références à partir du site NCBI pour chaque espèce obtenue en résultat Blast. En comparant les séquences de mes échantillons avec les séquences de référence et en utilisant les données du site NCBI, il est possible de localiser sur les séquences les régions 18 S, ITS1, 5,8 S et ITS2.

Je me suis tout d'abord intéressé à l'échantillon D22b. Il a fallu importer plusieurs séquences de références afin de recouvrir la séquence D22b autant en ITS1 et en ITS4. On observe plusieurs délétions mais également des insertions et des substitution entre D22b et les séquences de références.

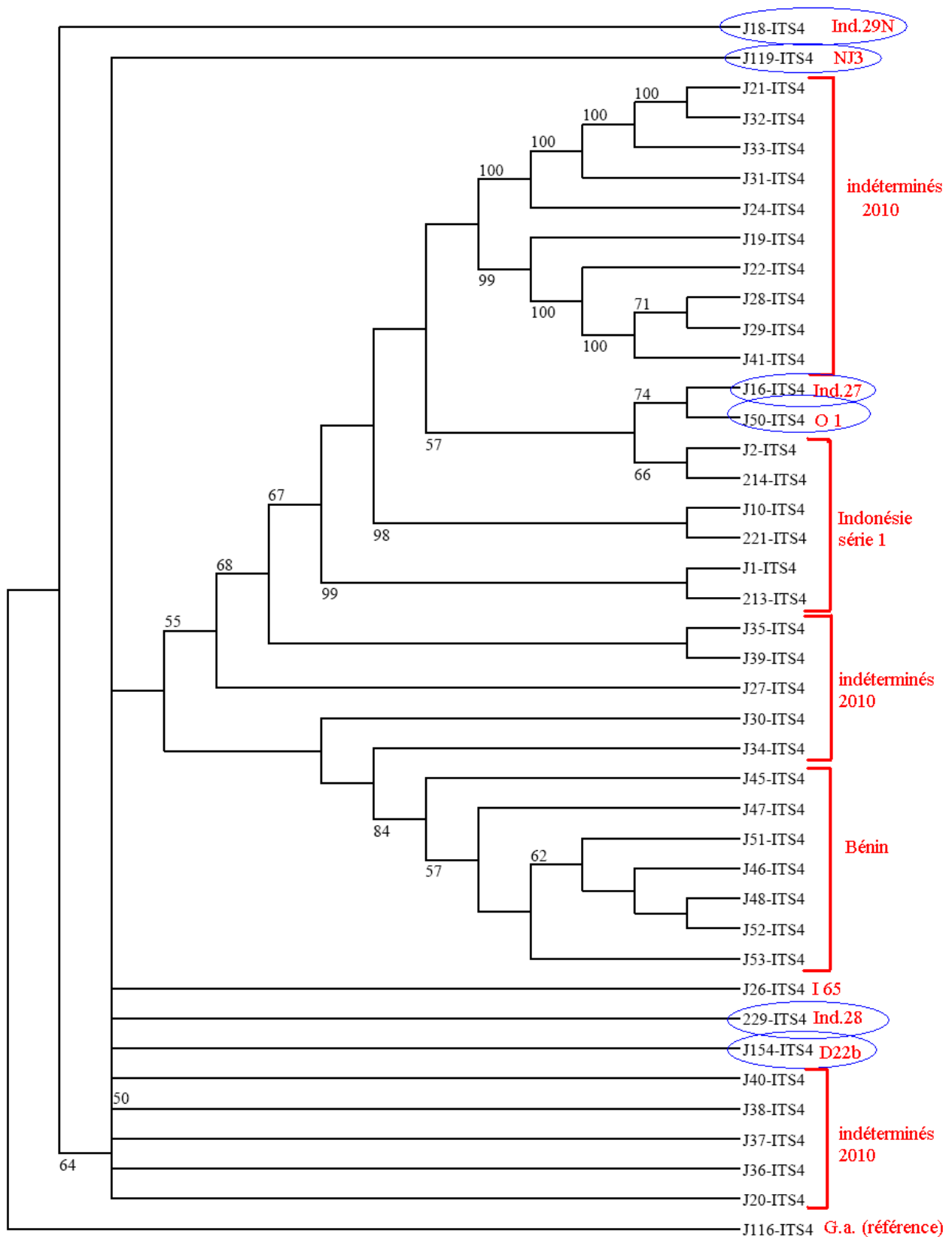


Figure 13 : Cladogramme des *Ganoderma* en ITS4

Cladogramme réalisé à l'aide du logiciel SeaView4 avec l'option « distance method » et un « bootstrap » de 50.

- **Construction d'arbres phylogénétiques :**

J'ai réalisé quatre arbres phylogénétiques à l'aide successivement des logiciels BioEdit et SeaView4. L'objectif est de comparer l'éloignement génétique entre les différents individus. Nous nous attendons à observer des groupes correspondant aux différentes régions et périodes de prélèvement.

Toutes les séquences en ITS4 et en ITS1 ayant pour résultat Blast *Ganoderma* ont été comparées dans deux arbres distincts. Ensuite ce sont toutes les séquences en ITS4 et en ITS1 ayant pour résultat Blast des champignons ou des levures; *Ganoderma* inclus; qui ont été comparées dans deux arbres distincts.

D'après l'arbre de *Ganoderma* en ITS4 (voir Figure 13 : Cladogramme des Ganoderma en ITS4), il apparaît que Ind.29N est une souche à part vis-à-vis des autres. Mais cela n'a pas pu être confirmé par le séquençage en ITS1 puisque la séquence de Ind.29N ne nous est pas revenue. Le reste de l'arbre est en conformité avec les hypothèses de départ, sauf pour quelques individus de la série 1 d'Indonésie, ainsi que O1 du Bénin et D22b, un fragment de bois prélevé en mars 2011 sur le site de Tanah Gambus. Nous retrouvons cette disposition sur l'arbre ITS1 pour *Ganoderma*, qui ne compte que six individus, ce qui ne nous permet pas une interprétation poussée.

L'arbre regroupant tous les champignons et les levures en ITS4 est le plus grand avec 117 individus, cela le rend difficile à interpréter, néanmoins nous notons une bonne corrélation entre les échantillons d'Indonésie et leur duplicatas. Mais ils sont répartis sur l'ensemble de l'arbre. Tout comme observé pour le cladogramme de *Ganoderma* en ITS4, les échantillons du Bénin et les indéterminés de 2010 forment deux groupes. Pour les tissus de palmier à huile, il y a une bonne corrélation au sein d'un même tronc mais ils sont répartis sur presque tout l'arbre.

L'arbre regroupant les champignons et les levures en ITS1, ne concerne que la série 1 d'Indonésie et cinq échantillons de la série 2 d'Indonésie. Si deux des individus de la série 2 sont regroupés, les trois autres sont répartis sur l'ensemble de l'arbre. De plus, en comparant les données des différents individus d'une même « branche », il n'y aurait pas de corrélation entre la « parcelle », l'« âge » et les « symptômes des feuilles » et l'espèce présente, mais cette observation ne concerne que 6 groupes de 18 échantillons au total.

4. Discussion

- **Extraction D'ADN :**

Les ADN provenant des fragments de bois qui n'avaient pas subi de choc thermique (7.4 à 22.5), ont été bien amplifiés, ce qui m'amène à proposer de ne plus l'utiliser pour de prochains échantillons. Cela représenterait surtout un gain de temps. Cette étape de la manipulation dure environ 30 minutes.

- **Vérification de la pureté et de la concentration de l'ADN de chaque échantillon :**

L'utilisation de l'enzyme RNase A nous permet de dégrader les molécules d'ARN, cela doit nous assurer une meilleure pureté des échantillons, vérifiée à l'aide du ratio d'absorbance 260/280. Mais les résultats obtenus par spectrométrie nous indiquent qu'une grande majorité de nos échantillons ont été mal purifiés. Le temps d'incubation (ici 15 minutes) est peut être trop court, un délai supplémentaire permettrait à l'enzyme de digérer les ARN plus efficacement.

De plus, même les témoins négatifs; parmi lesquels de l'eau pure; présentent des contaminations, ce qui signifie qu'il y a eu une ou plusieurs erreurs de manipulation et que les solutions utilisées sont potentiellement contaminées elles aussi.

Nous ne souhaitons pas obtenir de valeurs précises mais seulement nous assurer qu'il y a de l'ADN et connaître sa pureté. Ainsi, malgré les faibles concentrations obtenues et surtout les valeurs d'absorbances hors des limites de détection, une amplification correcte des ADN extraits a pu être effectuée.

- **Réalisation d'une PCR sur les ADN extraits :**

Le fait qu'il ait fallu refaire plusieurs PCR afin d'amplifier certains échantillons signifie que le mélange des différents réactifs ne s'étaient pas produits lors des précédentes PCR. Cela peut être dû à une étourderie de manipulation, j'aurais oublié un réactif dans certains des puits. Ou encore, les volumes ; particulièrement celui de l'enzyme ; étant très faibles, il est possible qu'un des réactifs déposé sur le paroi du puits ne se soit pas mélangé avec les autres.

Les gels obtenus à la suite de ces PCR présentent néanmoins l'amplification d'un fragment d'ADN d'environ 700 paires de bases, les paramètres ne sont pas à revoir d'après moi.

- **Migration sur gel d'agarose :**

Les conditions de migration (0,8% d'agarose, TAE 1X, et une électrophorèse de 35 minutes à 125 V) sont adaptées aux résultats que nous souhaitons obtenir, c'est-à-dire, la visualisation correcte du marqueur de poids moléculaire et d'une bande nette avec un poids moléculaire d'approximativement 700 paires de bases.

Pour ce qui ait des multiples amplifications par échantillon dans le cas des fragments de bois, il est tout à fait possible que plusieurs espèces fongiques soient présentes sur un même arbre. Et c'est une bonne chose dans le cas de cette étude, puisque nous visons à évaluer la biodiversité fongique associée au palmier à huile. Donc tous les champignons présents seront référencés et inclus dans la construction des arbres phylogénétiques au même titre que *Ganoderma boninense*.

- **Nettoyage des séquences et analyse par Blast :**

La présence de plusieurs séquences sur le même chromatogramme a rendu leur nettoyage inutile. Ces contaminants sont dus au fait que nos amorces ITS 1 et ITS 4 permettent l'amplification de toutes les espèces fongiques. Cela concerne autant les échantillons issus de troncs de palmier à huile que les carpophores, cela fausse complètement l'analyse Blast. Pour les échantillons concernés, une purification sur milieu de culture a été réalisée afin de pouvoir isoler les différents champignons et de pouvoir les amplifier séparément.

Les résultats Blast nous fournissent plusieurs espèces *Ganoderma* avec le même pourcentage d'identité, il est impossible de discriminer les différentes espèces au delà du genre. En effet l'étude de la diversité intra-spécifique est impossible du fait d'une trop faible variabilité de la région située entre ITS 1 et ITS 4. Il n'est possible que de faire une étude sur la diversité inter-spécifique.

Les séquences alignées afin de déterminer les variations entre les espèces peuvent présenter des erreurs. En effet les différences observées, que ce soit une insertion, une délétion ou une substitution de nucléotides peuvent être dues à du polymorphisme entre les séquences mais aussi à des erreurs de la polymérase ou encore des erreurs survenues lors du séquençage.

L'amélioration apportée par la polymérase Phusion dans l'obtention de produit PCR n'a pas permis néanmoins l'obtention de séquence « plus propres » ou même l'obtention d'un plus grand nombre de *Ganoderma*.

- **Construction d'arbres phylogénétiques :**

La présence d'individus isolés par rapport à ceux appartenant à la même série peut s'expliquer par des contaminations lors de l'extraction, même si cela est peu probable puisque les échantillons concernés n'ont ni été stockés aux mêmes endroits, ni traités les mêmes jours. Des erreurs engendrées par la Taq polymérase ou lors du séquençage ne seraient pas assez importantes pour être responsables de ces modifications sur l'arbre. Des contaminations lors de la PCR sont plus probables au vu de la précision et de la propreté que requière cette manipulation.

Si aucune contamination n'est responsable de ces résultats, cela signifie que les espèces concernées sont présentes sur plusieurs parcelles à la fois. Si certaines de ces espèces sont classiquement présentes chez le palmier à huile et n'affectent pas sa croissance, dans le cas de *Ganoderma*, cela signifie que la parcelle est partiellement infectée.

L'observation me laissant supposer une absence de corrélation entre « parcelle », « âge » et « symptômes des feuilles » et la présence des espèces concerne trop peu d'échantillons pour me permettre d'affirmer cela avec certitude. Néanmoins il s'agit d'une piste à approfondir. Mais pour cela, il faudrait connaître ces paramètres pour tous les échantillons, or dans notre cas ces données ne sont connues que pour les échantillons d'Indonésie des séries 1 et 2 et certains échantillons du Bénin. Je suggère de refaire des prélèvements dans les parcelles sur d'autres arbres, d'âge différent et présentant des symptômes variés.

5. Conclusions

a) Vis-à-vis de la problématique :

Tout d'abord, du point de vue de l'objectif scientifique fixé, les expériences que j'ai réalisées ont mené à un faible apport de nouvelles données sur les champignons associés au palmier à huile et à son dépérissement, du fait du peu de résultats obtenus ou de résultats inexploitable. Seules quelques pistes ont pu être dégagées en vu, peut être, d'une étude plus poussée ces prochaines années.

De plus, bien qu'il y ait une mise en évidence de problèmes, particulièrement dans le protocole d'extraction, il n'a pas été possible de lancer une réflexion sur le sujet.

Je regrette également que cette étude ne comporte pas un volet protéomique qui apporterait beaucoup à la compréhension de la maladie affectant le palmier à huile.

b) Vis-à-vis du stage :

D'un point de vue plus personnel, ce stage m'a permis de découvrir le milieu du travail et particulièrement celui de la recherche.

J'ai eu à faire preuve d'indépendance autant dans la gestion du planning que lors la manipulation au laboratoire. Bien que j'ai eu à gérer seule mes manipulations, j'ai toujours pu compter sur la collaboration des autres stagiaires et des deux responsables du laboratoire. Ainsi, nous avons pu partager nos connaissances et nos réflexions afin de mener au mieux nos projets respectifs.

Ce stage n'aura pas présenté de réelles difficultés sur le plan technique mais il m'a permis l'apprentissage de l'utilisation de logiciels de nettoyage et d'alignement de séquences. C'est un travail post-Blast qui ne m'avait pas été encore proposé lors de mon cursus, mais qui apporte pourtant des informations importantes lors d'une étude sur l'écologie et l'interaction inter-spécifique.

Ce stage restera une bonne expérience sur le plan personnel.

Références

- **Bibliographie :**

Adaskaveg J.E., Gilbertson R.L. (1990) << Comparative studies of delignification caused by ganoderma species >> Appl Environ Microbiol; 56(6) :1932-43

Breton F., De Franqueville H., Zaremski A. (15 janvier 2011)<< Rapport du projet GANODIV : Caractérisation moléculaire de la biodiversité fongique et identification précoce des champignons associés au phénomène de dépérissement des palmiers à huile, en particulier *Ganoderma boninense* >>

Butler E.J. (1909) «Some diseases of palms» The Agricultural Journal of India I : 209-310

Chong K., Rossall S. and Markus A. (2010) << Potential Antimicrobial Properties From Oil Palm Root Against *Ganoderma boninense* >> School of Sustainable Agriculture, Universiti Malaysia Sabah, 88999, Kota Kinabalu, Sabah, Malaysia 2Division of Plant and Crop Sciences, Sutton Bonington Campus, University of Nottingham, Loughborough, LE 12 5RD, United Kingdom

Durand-Gasselin T., Asmady H., Flori A., Jaquemard J.C., Hayun Z., Breton F., De Franqueville H. (2005) << Possible sources of genetic resistance in oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) to basal stem rot caused by *Ganoderma boninense* – prospects for future breeding >> Mycopathologia 159: 93–100

Flood J., Keenan L., Wayne S., Hasan Y. (2005) << Studies on oil palm trunks as sources of infection in the field >> Mycopathologia 159: 101–107

Graille J., Pina M. (mars-avril 1999) << l'huile de palm : sa place dans l'alimentation humaine >> Plantations, recherche, developpement. Vol.6 n°2 : 85-90

Hasan Y., Foster H.L., Flood J. (2005) << Investigations on the causes of upper stem rot (USR) on standing mature oil palms >> Mycopathologia 159: 109–112

Ho Y.W., Nawawi A. (1985) << Communication I *Ganoderma boninense* Pat. from Basal Stem Rot of Oil Palm (*Elaeis guineensis*) in Peninsular Malaysia >> Pertanika 8(3), 425 – 428

Panchal G., Bridge P.D. (2005) << Following basal stem rot in young oil palm plantings >>. Mycopathologia 159: 123–127

Pilotti C.A., Bridge P.D. (2002) << Basal stem rot: probing the facts >> The Planter; 78(916): 365–370

Pilotti C.A. (2005) << Stem rots of oil palm caused by *Ganoderma boninense*: Pathogen biology and epidemiology >> Mycopathologia 159: 129–137

Sanderson F.R. (2005) << An insight into spore dispersal of *Ganoderma boninense* on oil palm >> Mycopathologia 189 A Rockinghorse Road, Southshore, Christchurch, New Zealand 159: 139–141

Sankaran K.V., Bridge P.D., Gokulapalan C. (2005) << *Ganoderma* diseases of perennial crops in India – an overview >> Mycopathologia 159: 143–152

Steyaert R.L. (Dec. 31, 1967) << Les *Ganoderma* palmicoles >> Bulletin du Jardin botanique national de Belgique, Vol. 37, No. 4 , pp. 465-492

Susanto A., Sudharto P.S., Purba R.Y. (2005) << Enhancing biological control of basal stem rot disease (*Ganoderma boninense*) in oil palm plantations >> Mycopathologia 159: 153–157

Utomo C., Werner S., Niepold F., Deising H.B. (2005) << Identification of *Ganoderma*, the causal agent of basal stem rot disease in oil palm using a molecular method >> Mycopathologia 159: 159–170

- **Webographie :**

<http://intranet-bios.cirad.fr/>

<http://www.palmelit.com/>

<http://www.macrogen.com/>

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>

Annexes

- a : liste des échantillons et des sous échantillons de troncs

Catégories					
Indonésie		Indonésie duplicate	Bénin	Indéterminés 2010	témoins
série 1	série 2	série 1			
Ind.1	carpophore	carpophore	B1	I 21	Positifs : <i>G. lucidum</i> <i>G. athensorii</i> IC 14 NJ3 Négatifs : t (-) avec de l'eau millipore
2			B2	I 24	
3	D.1	Ind.1	B3	I 28	
4	D.2	Ind.5		I 28	
Ind.5	D.3	Ind.8	P1	I 35	
6	D.4	Ind.10	P2	I 45	
7	D.5	Ind.11	P3	I 47	
Ind.8	D.6	Ind.12	P4	I 60	
9a	D.7	Ind.13	P5	I 65	
9b	D.8	Ind.14			
9c	D.9	Ind.15	O1	D II 43 (1)	
Ind.10	D.10	Ind.16	O2	D II 43 (2)	
Ind.11	D.11	Ind.20	O3	D II 43 (3)	
Ind.12	D.12	Ind.23	O4	D II 43 (4)	
Ind.13	D.16	Ind.24		D III 44	
Ind.14	D.20	Ind.25		D III 44 (1)	
Ind.15	D.24	Ind.26		D III 44 (2)	
Ind.16	D.26	Ind.27		D III 53 (2)	
17		Ind.28			
18		Ind.29N		RSSP3B1	
19				H70/11 TSSR	
Ind.20				H70/11 TSSR	
21	tronc	tronc		TSS H/R	
22				D 511	
Ind.23	D.13	2			
Ind.24	D.14	3		85200 (3)	
Ind.25	D.15	4		86200 (2)	
Ind.26	D.17	6		86200 (3)	
Ind.27	D.18	7			
Ind.28	D.19	9a			
Ind.29N	D.21	9b			
	D.22	9c			
	D.23	17			
	D.25	18			
	D.27	19			
	D.28	21			
		22			

N° de troncs	Sous-échantillons de la série 1					
	0	1	2	3	4	5
2	X	X	X	X	X	
3	X	X	X	X	X	X
4	X	X	X			
6	X	X	X	X	X	X
7	X	X	X	X	X	X
9a	X	X	X	X	X	X
9b	X	X	X	X		
9c	X	X	X	X		
17	X	X	X	X	X	
18	X	X	X	X		
19	X	X	X			
21	X	X	X	X		
22	X	X	X	X	X	X
total	62					

- **b : Amorces ITS1 et ITS4**

ITS1 : 5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGC-3'

ITS4 : 5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'

• c : Tableau des résultats Blast complet

N° CIRAD	N° accession	Blast	Numéro de parcelle	Age (an)	Symptôme des feuilles
Ind.1	EU701010	Ganoderma boninense	IV	9	Léger
Ind.5	EU841913.1	Ganoderma boninense	IV	9	Léger
Ind.8	AF452119.1	Endothia viridistroma	IV	11	Intermédiaire
Ind.10	FN428887.1	Pichia caribbica	IV	12	Léger
Ind.11	GU318454.1	Ixodes scapularis	IV	12	Léger
Ind.12	FJ499435.1	Galactomyces geotrichum	IV	12	Léger
Ind.13	GU062239.1	Basidiomycota sp.	IV	14	Léger
Ind.14	GU246264.1	Candida savonica	IV	11	Intermédiaire
Ind.15	FJ553376.1	Uncultured Saccharomycetes	IV	11	Léger
Ind.16	EU841913.1	Ganoderma boninense	IV	20	Important
Ind.20	AF444665.1	Bullera sinensis var.	II	5	Léger
Ind.23	HM777040.1	Dipodascus sp.	III	25	Léger
Ind.24	GQ458034.1	Galactomyces geotrichum	III	25	Sain
Ind.25	FJ769426.1	Arxula adenivorans	III	24	Important
Ind.26	GQ458034.1	Galactomyces geotrichum	III	24	Sain
Ind.27	GU213485.1	Ganoderma lucidum	III	22	Sain
Ind.28	HM210837.1	Galactomyces geotrichum	III	22	Sain
Ind.29N	EU239386.1	Ganoderma aff. steyaertanum	?	?	?
I21	EU841913.1	Ganoderma boninense	?	?	?
I24	EU239386.1	Ganoderma aff. steyaertanum	?	?	?
I28	EU239386.1	Ganoderma aff. steyaertanum	?	?	?
I35	EU239386.1	Ganoderma aff. steyaertanum	?	?	?
I45	U66449.1 OPU66449	Om phalina philonotis	?	?	?
I47	EU841913.1	Ganoderma boninense	?	?	?
I60	EF042105.1	Phialemonium cf. curvatum	?	?	?
I65	EU841913.1	Ganoderma boninense	?	?	?
DII 43(1)	EU841913.1	Ganoderma boninense	?	?	?
DII 43(2)	FJ655465.1	Ganoderma australe	?	?	?
DII 43(3)	AB509645.1	Ganoderma mastoporum	?	?	?
DII 43(4)	EU841913.1	Ganoderma boninense	?	?	?
DIII 44	EU841913.1	Ganoderma boninense	?	?	?
DIII 44(1)	EU239386.1	Ganoderma aff. steyaertanum	?	?	?
DIII 44(2)	165941430 EU239386.1	Ganoderma aff. steyaertanum	?	?	?
DIII 53(2)	gij165941430 EU239386.1	Ganoderma aff. steyaertanum	?	?	?
RSSP3B1	gij165941430 EU239386.1	Ganoderma aff. steyaertanum	?	?	?
H70/11 TSSR	gij165941430 EU239386.1	Ganoderma aff. steyaertanum	?	?	?
TSS H/R	gij165941430 EU239386.1	Ganoderma aff. steyaertanum	?	?	?
D511	gij165941430 EU239386.1	Ganoderma aff. steyaertanum	?	?	?
85200 (3)	gij165941430 EU239386.1	Ganoderma aff. steyaertanum	?	?	?
86200 (2)	gij165941430 EU239386.1	Ganoderma aff. steyaertanum	?	?	?
86200 (3)	gij165941430 EU239386.1	Ganoderma aff. steyaertanum	?	?	?
B1	gij229614562 FM202496.1	Physisporinus vitreus	203 C	?	?
B2	gij229614562 FM202496.1	Physisporinus vitreus	203 C	?	?
B3	gij229614562 FM202496.1	Physisporinus vitreus	203 C	?	?
P1	gij165941430 EU239386.1	Ganoderma aff. steyaertanum	?	?	?
P2	gij165941430 EU239386.1	Ganoderma aff. steyaertanum	?	?	?
P3	gij165941430 EU239386.1	Ganoderma aff. steyaertanum	?	?	?
P4	gij165941430 EU239386.1	Ganoderma aff. steyaertanum	?	?	?
P5	gij326486745 HQ596918.1	Penicillium citrinum	?	?	?
O1	gij165941430 EU239386.1	Ganoderma aff. steyaertanum	?	?	?
O2	gij165941430 EU239386.1	Ganoderma aff. steyaertanum	?	?	?
O3	gij165941430 EU239386.1	Ganoderma aff. steyaertanum	?	?	?
O4	gij165941430 EU239386.1	Ganoderma aff. steyaertanum	?	?	?

2_0	gij297373280 FN428941.1	<i>Pichia caribbica</i>	IV	9	Léger
2_1	gij157326094 EU135909.1	<i>Gastrodia elata</i>	IV	9	Léger
2_2	gij157326092 EU135907.1	<i>Gastrodia elata</i>	IV	9	Léger
2_3	gij157326092 EU135907.1	<i>Gastrodia elata</i>	IV	9	Léger
2_4	gij157326092 EU135907.1	<i>Gastrodia elata</i>	IV	9	Léger
3_0	gij223006697 FJ623625.1	<i>Candida blattae</i>	IV	9	Léger
3_1	gij157326092 EU135907.1	<i>Gastrodia elata</i>	IV	9	Léger
3_2	gij157326092 EU135907.1	<i>Gastrodia elata</i>	IV	9	Léger
3_3	gij209973589 EU798698.1	<i>Issatchenkia orientalis</i>	IV	9	Léger
3_4	gij227345088 FJ875119.1	<i>Rhizomucor variabilis</i>	IV	9	Léger
3_5	gij297373226 FN428887.1	<i>Pichia caribbica</i>	IV	9	Léger
4_0	gij157326092 EU135907.1	<i>Gastrodia elata</i>	IV	9	Léger
4_1	gij223006697 FJ623625.1	<i>Candida blattae</i>	IV	9	Léger
4_2	gij223006697 FJ623625.1	<i>Candida blattae</i>	IV	9	Léger
6_0	gij223006697 FJ623625.1	<i>Candida blattae</i>	IV	9	Léger
6_1	gij74039678 AC165263.2	<i>Mus musculus</i>	IV	9	Léger
6_2	gij4186095 Y18134.1	<i>Squalus acanthia</i>	IV	9	Léger
6_3	gij157326094 EU135909.1	<i>Gastrodia elata</i>	IV	9	Léger
6_4	gij251815167 FM199972.1	<i>Issatchenkia orientalis</i>	IV	9	Léger
6_5	gij223006697 FJ623625.1	<i>Candida blattae</i>	IV	9	Léger
7_0	gij21666828 AF455401.1	<i>Issatchenkia orientalis</i>	IV	9	Léger
7_1	gij223006697 FJ623625.1	<i>Candida blattae</i>	IV	9	Léger
7_2	gij223006697 FJ623625.1	<i>Candida blattae</i>	IV	9	Léger
7_3	gij296170886 FN393999.1	<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	IV	9	Léger
7_4	FM199972.1	<i>Issatchenkia orientalis</i>	IV	9	Léger
7_5	gij329011676 HQ379158.1	<i>Hanseniaspora occidentalis</i>	IV	9	Léger
9a_0	gij327422174 JF736843.1	<i>Candida albicans</i>	IV	11	Intermédiaire
9a_2	gij329011683 HQ857740.1	<i>Meyerozyma guilliermondii</i>	IV	11	Intermédiaire
9a_3	gij330470885 HQ448930.1	<i>Meyerozyma guilliermondii</i>	IV	11	Intermédiaire
9a_4	gij329011685 HQ857742.1	<i>Meyerozyma guilliermondii</i>	IV	11	Intermédiaire
9a_5	gij329011685 HQ857742.1	<i>Meyerozyma guilliermondii</i>	IV	11	Intermédiaire
9b_0	gij327422174 JF736843.1	<i>Candida albicans</i>	IV	11	Intermédiaire
9b_1	gij327422174 JF736843.1	<i>Candida albicans</i>	IV	11	Intermédiaire
9b_2	gij330470885 HQ448930.1	<i>Meyerozyma guilliermondii</i>	IV	11	Intermédiaire
9b_3	gij329011684 HQ857741.1	<i>Metschnikowia pulcherrima</i>	IV	11	Intermédiaire
9c_0	gij330470885 HQ448930.1	<i>Meyerozyma guilliermondii</i>	IV	11	Intermédiaire
9c_1	gij327412593 FR820639.1	<i>Candida dubliniensis</i>	IV	11	Intermédiaire
9c_2	EU135909.1	<i>Gastrodia elata</i>	IV	11	Intermédiaire
9c_3	gij327412593 FR820639.1	<i>Candida dubliniensis</i>	IV	11	Intermédiaire
17_0	gij329011685 HQ857742.1	<i>Meyerozyma guilliermondii</i>	IV	20	Léger
17_1	gij329011685 HQ857742.1	<i>Meyerozyma guilliermondii</i>	IV	20	Léger
17_2	gij329011685 HQ857742.1	<i>Meyerozyma guilliermondii</i>	IV	20	Léger
17_3	EU568999.1	<i>Pichia caribbica</i>	IV	20	Léger
18_3	HQ265521.1	<i>Elaeis oleifera</i> 18S	IV	20	Sain
19_0	HM231275.1	<i>Candida tropicalis</i>	IV	20	Sain
19_1	HQ014734.1	<i>Candida tropicalis</i>	IV	20	Sain
19_2	HQ014734.1	<i>Candida tropicalis</i>	IV	20	Sain
21_3	EU135909.1	<i>Gastrodia elata</i>	II	5	Léger
G. a. (+)	GU731557.1	Ganoderma carnosum	?	?	?
G. l. (+)	gij330896825 HQ607428.1	<i>Streptomyces chartreusis</i>	?	?	?
I 14 (+)	gij330470885 HQ448930.1	<i>Meyerozyma guilliermondii</i>	?	?	?
T (+) NJ3	EU239386.1	Ganoderma aff. steyaertanum	?	?	?
D7	FN424104.1	<i>Candida sojae</i>	III	15	Important
D13b	HQ398237.1	<i>Candida tropicalis</i>	II	8	Important
D14b	HQ398237.1	<i>Candida tropicalis</i>	II	8	Important
D16	FJ623625.1	<i>Candida blattae</i>	II	13	Important
D22b	EU239386.1	Ganoderma aff. steyaertanum	III	25	?
D2	EF197951.1	<i>Pichia guilliermondii</i>	III	15	Important
D7	GU478316.1	<i>Pichia guilliermondii</i>	III	15	Important
D14b	FN424104.1	<i>Candida sojae</i>	II	8	Important
D22b	EU239386.1	Ganoderma aff. steyaertanum	III	25	?
D23b	EF197951.1	<i>Pichia guilliermondii</i>	III	25	?
Ind.1	EU918695.1	Ganoderma gibbosum	IV	9	Léger
Ind.5	EU239386.1	Ganoderma aff. steyaertanum	IV	9	Léger
Ind.8	gij332384187 JF705212.1	<i>Thanatephorus cucumeris</i>	IV	11	Intermédiaire

Ind.10	HQ693781.1	<i>Meyerozyma caribbica</i>	IV	12	Léger
Ind.11	gij332656411 CP002687.1	<i>Arabidopsis thaliana</i>	IV	12	Léger
Ind.12	DQ286062.1	<i>Galactomyces</i> sp.	IV	12	Léger
Ind.13	AY575919.1	<i>Anamika angustilamellata</i>	IV	14	Léger
Ind.15	EU486458.1	<i>Ganoderma carnosum</i>	IV	11	Léger
Ind.16	AM470532.2	<i>Vitis vinifera</i>	IV	20	Important
Ind.20	GQ458034.1	<i>Galactomyces geotrichum</i>	II	5	Léger
Ind.23	GQ458034.1	<i>Galactomyces geotrichum</i>	III	25	Léger
Ind.24	FM178321.1	<i>Arxula adenivorans</i>	III	25	Sain
Ind.25	GQ458034.1	<i>Galactomyces geotrichum</i>	III	24	Important
Ind.26	FJ623599.1	<i>Candida bolitotheri</i>	III	24	Sain
Ind.27	FN597573.1	<i>Galactomyces geotrichum</i>	III	22	Sain
Ind.28	EU239386.1	<i>Ganoderma aff. steyaertanum</i>	III	22	Sain
Ind.29N	AB220245.1	<i>Arthrinium urticae</i>	?	?	?
Ind.19	EU135909.1	<i>Gastrodia elata</i>	IV	20	Sain
Ind.22	FN428931.1	<i>Pichia caribbica</i>	II	5	Léger
Ind.17	EU100744.1	<i>Candida akabanensis</i>	IV	20	Léger
Ind.7	AM158923.1	<i>Candida fukuyamaensis</i>	IV	9	Léger
Ind.3	HQ248205.1	<i>Ceratocystis paradoxa</i>	IV	9	Léger
Ind.4	AM408412.1	<i>Caloplaca arnoldii</i>	IV	9	Léger
Ind.9a	EU100744.1	<i>Candida akabanensis</i>	IV	11	Intermédiaire
Ind.9b	EU135909.1	<i>Gastrodia elata</i>	IV	11	Intermédiaire
Ind.2	FN547681.1	<i>Glomus versiforme</i>	IV	9	Léger
Ind.21	EU239386.1	<i>Ganoderma aff. steyaertanum</i>	II	5	Léger
Ind.1	EU239386.1	<i>Ganoderma aff. steyaertanum</i>	IV	9	Léger
Ind.5	EU239386.1	<i>Ganoderma aff. steyaertanum</i>	IV	9	Léger
Ind.8	EF568082.1	<i>Trichomonascus ciferrii</i>	IV	11	Intermédiaire
Ind.10	FN428887.1	<i>Pichia caribbica</i>	IV	12	Léger
Ind.11	EF381555.1	Uncultured leaf litter fungus	IV	12	Léger
Ind.12	DQ683114.1	<i>Galactomyces geotrichum</i>	IV	12	Léger
Ind.13	FJ717463.1	<i>Panagrolaimus paetzoldi</i>	IV	14	Léger
Ind.14	gij332648408 JF895463.1	<i>Fomitiporia aethiopica</i>	IV	11	Intermédiaire
Ind.15	EU239386.1	<i>Ganoderma aff. steyaertanum</i>	IV	11	Léger
Ind.20	DQ683114.1	<i>Galactomyces geotrichum</i>	II	5	Léger
Ind.24	EF568082.1	<i>Trichomonascus ciferrii</i>	III	25	Sain
Ind.25	GQ458034.1	<i>Galactomyces geotrichum</i>	III	24	Important
Ind.26	FJ623600.1	<i>Candida atakporum</i>	III	24	Sain
Ind.27	AJ279445.1	<i>Galactomyces geotrichum</i>	III	22	Sain
Ind.28	GU213486.1	<i>Ganoderma mastoporum</i>	III	22	Sain
Ind.29N	EF192229.1	<i>Candida tropicalis</i>	?	?	?
Ind.19	EF197945.1	<i>Candida boidinii</i>	IV	20	Sain
Ind.22	EF197810.1	<i>Candida carpophila</i>	IV	20	Sain
Ind.17	FJ623625.1	<i>Candida blattae</i>	II	5	Léger
Ind.17	EU100744.1	<i>Candida akabanensis</i>	IV	20	Léger
Ind.7	EF197951.1	<i>Pichia guilliermondii</i>	IV	9	Léger
Ind.3	HQ248205.1	<i>Ceratocystis paradoxa</i>	IV	9	Léger
Ind.4	DQ207898.1	<i>Prionolejeunea aemula</i>	IV	9	Léger
Ind.9a	FJ623625.1	<i>Candida blattae</i>	IV	11	Intermédiaire
Ind.9b	EU135907.1	<i>Gastrodia elata</i>	IV	11	Intermédiaire
Ind.2	AF122018.1	<i>Steinernema neocurtillae</i>	IV	9	Léger
06-305	FJ623624.1	<i>Candida dosseyi</i>	?	?	?
Ind.9c	FJ623625.1	<i>Candida blattae</i>	?	?	?
06-022b	AJ496278.1	<i>Legionella pneumophila</i>	?	?	?
06-169	NM_001043540.1	<i>Bombyx mori</i>	?	?	?

Résumé

Dans cette étude, encore en cours, la biodiversité mondiale de *Ganoderma boninense* ainsi que d'autres champignons associés au dépérissement du palmier à huile est en train d'être déterminée. *G. boninense* est responsable de la pourriture de la base du stipe (BSR). Dans cet article, seuls les résultats concernant les échantillons indonésiens et bénins seront présentés. Pour la première fois, des tissus frais ont été utilisés pour extraire l'ADN total à partir de troncs de palmier à huile. Utilisant des amorces spécifiques des champignons ITS1 et ITS4, une PCR (polymerase chain reaction) a permis d'amplifier les régions ITS2 et ITS1, localisés au niveau de l'ADN ribosomique 5,8 S. ITS2 et ITS1 sont des régions polymorphes. Une fois les séquences obtenues et après une analyse Blast sur le site NCBI, les espèces correspondantes ont été déterminées. Ces résultats ont permis de construire des arbres phylogénétiques. D'après les premiers résultats, des défauts ont été détectés durant les expérimentations. Le protocole doit encore être amélioré afin de pouvoir obtenir des résultats acceptables.

mots clé : *Ganoderma boninense*, Palmier à huile, tissus frais, ITS, PCR, arbres phylogénétiques.

Abstract

In this study, the global biodiversity of *Ganoderma boninense* and other fungi associated to the oil palm decay is on going to be determined. *Ganoderma boninense* is responsible for BSR (Basal Stem Rot). In this purpose, only results concerning Indonesian and Benian samples will be present. For the first time, fresh tissues have been used to extract total DNA from oil palm stem. Using ITS1 and ITS4 fungal specific primers, a PCR (Polymerase Chain Reaction) allowed to amplify ITS2 and ITS1 regions, localized in the 5,8 S ribosomal DNA region. ITS2 and ITS1 are polymorphous regions. Once sequences obtained and after a Blast analyse on NCBI, matching species were determined. Finally these results allowed to construct phylogenic trees. As reported by first results, some flaws have been detect during experiences. The protocol must be improved to obtain acceptable results.

key words : *Ganoderma boninense*, oil palm, fresh tissu, ITS, PCR, phylogenic trees.